

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Appl. No.	:	10/720,424	Confirmation No.	To be assigned
Applicant	:	Sang-Wha Lee et al.		
Filed	:	November 24, 2003		
TC/A.U.	:	To be assigned		
Examiner	:	To be assigned		
Docket No.	:	NEIT-P0018		
Customer No.	:	27268		

CLAIM FOR PRIORITY


Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicant hereby claims foreign priority benefits under Title 35, United States Code Section 119, of Korean Application No. 2003-0053147 filed on July 31, 2003 and Korean Application No. 2002-0075370 filed on November 29, 2002. Certified copies of the priority documents are enclosed herewith.

In the event the Applicant has overlooked the need for an extension of time, an additional extension of time, payment of fee, or additional payment of fee, Applicant hereby conditionally petitions therefor and authorizes that any charges be made to Deposit Account No. 02-0390, Baker & Daniels.

Should any questions concerning any of the foregoing arise, the Examiner is invited to telephone the undersigned at (317) 237-0300.

<p align="center">Certificate of Mailing/Transmission (37 C.F.R. 1.8(a))</p> <p>I hereby certify that, on the date shown below, this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage for first class mail in an envelope addressed to the address above on the date indicated below.</p> <p>December 18, 2003</p> <p>By:  Kevin R. Erdman, Registration No. 33,687 Name of Registered Representative</p>
--

Respectfully submitted,



Kevin Erdman
Registration No. 33,687
Attorney for Applicant
Baker & Daniels
300 North Meridian Street, Suite 2700
Indianapolis, IN 46204
Telephone: (317) 569-9600
Facsimile: (317) 569-4800



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0053147
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 07월 31일
Date of Application JUL 31, 2003

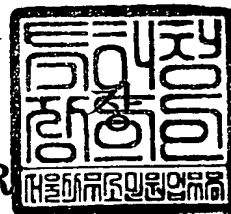
출원인 : (주)알바이오메드
Applicant(s) ALBIOMED CO., LTD



2003 년 11 월 21 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.07.31
【발명의 명칭】	중합효소연쇄반응에 의한 다양한 유형의 인유두종바이러스를 검출하기 위한 신규한 피씨알 공통 프라이머와 이를 이용한 검출방법
【발명의 영문명칭】	Novel PCR General Primers and Method for Detecting Diverse Types of Human Papillomavirus by PCR
【출원인】	
【명칭】	(주)알바이오메드
【출원인코드】	1-2002-026688-7
【대리인】	
【성명】	정원기
【대리인코드】	9-1998-000534-2
【포괄위임등록번호】	2002-056025-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상화
【성명의 영문표기】	LEE,SANG HWA
【주민등록번호】	641202-1767719
【우편번호】	449-905
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 상갈리 461 대우현대아파트 108-102
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	나광훈
【성명의 영문표기】	NA,KWANG HUN
【주민등록번호】	720228-1535233
【우편번호】	156-032
【주소】	서울특별시 동작구 상도2동 22-82번지 202호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김승조
【성명의 영문표기】	KIM,SEUNG JO

【주민등록번호】	341119-1068318
【우편번호】	137-040
【주소】	서울특별시 서초구 반포동 590-54 효성빌라 15-302
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	차광렬
【성명의 영문표기】	CHA,KWANG YUL
【주민등록번호】	521223-1005712
【우편번호】	135-270
【주소】	서울특별시 강남구 도곡동 193-1 힐데스하임빌라 702호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	고정재
【성명의 영문표기】	KO,JUNG JAE
【주민등록번호】	591014-1925116
【우편번호】	449-912
【주소】	경기도 용인시 구성면 마북리 621 쌍용아파트 107-1502
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김연수
【성명의 영문표기】	KIM,YEON S00
【주민등록번호】	701206-1357311
【우편번호】	143-150
【주소】	서울특별시 광진구 군자동 474번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유강열
【성명의 영문표기】	YU,KWANG YEOL
【주민등록번호】	640416-1481111
【우편번호】	560-102
【주소】	전라북도 전주시 완산구 중노송2가동 702-6번지
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 16

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 정원기 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 37 면 37,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 13 항 525,000 원

【합계】 591,000 원

【감면사유】 소기업 (70%감면)

【감면후 수수료】 177,300 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 자궁경부암의 유발인자인 다양한 인유두종바이러스(Human Papillomavirus, HPV) 유형(genotype)내 존재하는 특정 염기서열의 DNA 단편을 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 통하여 검출하기 위한 신규한 PCR 공통 프라이머와 그를 이용한 다양한 HPV 유형의 존부를 검출할 수 있는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 다양한 유형의 HPV 핵산을 증폭할 수 있는 합성된 올리고 뉴클레오티드 서열과 이 올리고 뉴클레오티드를 프라이머로 이용하여 1회의 PCR 분석을 통하여 다양한 HPV 유형의 존부를 검출하는 방법을 제시하고 있다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

인유두종바이러스(Human Papillomavirus, HPV), PCR 공통 프라이머(PCR General Primer), 자궁경부암(Cervical Cancer), 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

【명세서】

【발명의 명칭】

중합효소연쇄반응에 의한 다양한 유형의 인유두종바이러스를 검출하기 위한 신규한 피씨알 공통 프라이머와 이를 이용한 검출방법{Novel PCR General Primers and Method for Detecting Diverse Types of Human Papillomavirus by PCR}

【도면의 간단한 설명】

도 1a 내지 도 1h는 각각 HPV-16 감염세포주인 CaSki(ATCC CRL- 1550), HPV-18 감염세포주인 HeLa(ATCC CCL-2) 및 HPV 비감염 세포주인 K562(KCLB-10243, Korean Cell Line Bank)를 표적 DNA로 하여 본 발명에서 합성한 8조의 프라이머를 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

도 2a 내지 도 2g는 본 발명에서 합성한 서열번호 1 내지 서열번호 14로 구성되는 7조의 프라이머를 사용하여 다양한 HPV Plasmid DNA를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

도 3은 본 발명에서 합성한 서열번호 15와 서열번호 16으로 구성되는 AlbioGP 프라이머를 사용하여 다양한 HPV Plasmid DNA를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

도 4a 내지 도 4t는 본 발명에서 합성한 서열번호 1 내지 서열번호 14로 구성되는 7조의 프라이머를 사용하여 자궁경부암과 관련된 것으로 진단된 인체에서 수득한 DNA를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

도 5a 내지 도 5j는 본 발명에서 합성한 서열번호 1 내지 서열번호 14로 구성되는 7조의 프라이머를 사용하여 자궁경부암과 관련 없는 것으로 진단된 인체에서 수득한 DNA를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<6> 본 발명은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, 이하 "PCR"이라 한다)을 통하여 인유두종바이러스(Human Papilloma Virus, 이하 "HPV"이라 한다.)를 증폭시킬 수 있는 프라이머 및 이를 이용한 HPV 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 다양한 유형(genotype)으로 구분되는 HPV DNA와 상보적으로 결합함으로써, 1회의 PCR 과정을 통하여 HPV DNA를 증폭시킬 수 있는 HPV 공통 프라이머와 이를 이용함으로써 다양한 유형의 HPV DNA를 증폭시킴으로써 샘플 내에 HPV가 존재하는 지 여부 및 이를 통한 자궁경부암 진단 방법에 관한 것이다.

<7> 자궁경부암은 자궁경부에서 발생하는 악성종양으로 전체 자궁암 발생빈도의 95% 이상을 차지하고 있으며, 전 세계 여성 암 가운데 유방암 다음으로 발생빈도가 높아 해마다 약 44만 건 정도가 신규로 보고되고 있다. 우리나라의 경우 2000년도 보건복지부 암 등록 조사통계를 보면 1년에 약 5,000여명의 새로운 환자들이 추가로 보고되고 있다. 여성의 경우 자궁경부암(10.6%)의 발생건수가 3803건으로 10대

암의 장기별 발생 빈도 상 위암(15.8%)과 유방암(15.1%)에 이어 3위를 차지하고 있다. 특히 최근엔 20~30대 젊은 여성의 감염율이 크게 늘어 전체 환자의 32%를 차지하는 등 국민보건상 심각한 문제로 대두되고 있다.

<8> 자궁경부암은 일반적으로 HPV가 자궁경부 상피 기저 세포에 감염한 후 저급 상피 이형성증, 고급 상피 이형성증 및 상피내암 등의 오랜 전구 단계를 거쳐 최종 침윤암으로 발전하게 되는데, 이처럼 암으로 발생하기 전 단계인 전암 단계 병변이 존재하기 때문에, 조기에 이들 병변의 효과적인 치료는 자궁경부암의 예방을 가능하게 할 것이다. 실제로 자궁경부암과 전암 단계 병변에 대한 조기 검진 프로그램이 구축되어 있는 이스라엘에서는 자궁경부암의 발생빈도가 10만명 당 3.8명 정도인데 비해 콜롬비아 등의 개발도상국에서는 10만명 당 48.2명의 높은 발생빈도를 보이고 있다.

<9> 현재까지의 연구를 통하여 자궁경부암의 발병원인은 성 접촉으로 인해 감염되는 HPV가 주 용인자인 것으로 밝혀졌다. HPV는 약 8kb 길이의 환상 이중나선 DNA 바이러스로서, HPV의 게놈에는 숙주 세포를 감염시킨 후 초기 과정에 관여하는 E1 ~ E7 유전자와 후기 과정에 관여하는 L1, L2 유전자가 존재한다. 특히 HPV가 숙주의 상피세포를 감염시킨 후에 발현되는 종양원성(oncogenic) 단백질인 E6와 E7은 각각 숙주세포의 종양 억제 단백질인 p53과 pRB와 결합하여 이들 종양억제 단백질의 기능을 억제함으로써, 결과적으로 감염 세포의 형질전환에 따른 종양형성으로 발전하는 것으로 규명되고 있다.

<10> 현재까지 HPV는 E6, E7, L1 유전자의 열린 해독틀(open reading frame, 이하

"ORF" 라 한다.) 서열의 차이에 따라 120 가지 이상의 다른 유형이 알려져 있다. 상기 ORF의 뉴클레오티드 서열이 10% 이상 다르면 새로운 유형으로 정의되고, 2%이상 10% 미만 다르면 아형(subtype)으로, 2% 미만이 다른 경우에는 변이체(variant)로 정의된다. 이 가운데 약 37종의 HPV 유형(HPV-2, -3, -6, -7, -10, -11, -13, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -61, -66, -67, -68, -69, -70, -73)이 자궁경부암을 야기하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 HPV의 감염과 자궁경부암과의 밀접한 관련성 및 자궁경부암에 의한 높은 사망률로 인하여 자궁경부암의 조기진단을 위한 방법이 모색되고 있다.

<11> 현재 자궁경부암과 전구 병변의 일차 선별을 위해 자궁경부 세포진의 세포학적 형태에 근거하는 세포진 검사(Papanicolaou(Pap) smear)가 1940년대부터 표준 검사법으로 시행되어 자궁경부암으로 인한 사망률을 크게 감소시키는데 일익을 담당해 왔으나 여전히 30~40%의 높은 위음성율을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

<12> 한편, HPV hybrid capture II는 자궁경부 세포진의 HPV DNA와 RNA probe 간의 액상 상보 결합을 항체 효소 발색에 의해 검출하는 법으로 1994년 개발 이래 자궁경부암과 전구 병변의 보조적 선별 또는 추적 검사의 한 방법으로서 활용되고 있으며 최근 미국 FDA로부터 일차 선별을 위한 사용 승인까지 받은 상태이다. 그러나 이러한 분석 방법들이 존재함에도 불구하고 전 세계적으로 자궁경부암으로 인한 5~50만의 사망자 수에서 알 수 있듯이 자궁경부암 및 전구 병변의 포괄적 초기 검색을 위한 범용적 방법의 개발 필요성은 여전히 높은 것이 현실이다.

<13> 최근 다수의 HPV 유형의 감염 여부를 검출함에 있어서 특정 염기서열의 DNA 단편을 신속하고 간단하게 증폭시킬 수 있는 PCR 기법이 보편화되면서 지금까지 밝혀진 모든 HPV를 포괄적으로 검출하고자 하는 노력이 활발하게 시도되고 있다.

- <14> PCR 기법은 목적 병원체의 핵산 염기서열에 특이적으로 결합하는 상보적 핵산(올리고머 프라이머)을 가하여 온도에 따른 변성(denaturation), 재결합(annealing) 및 중합(polymerization) 과정을 반복하여 미량의 병원체 핵산을 증폭시켜 그 존부를 검출할 수 있는 기술로서(미합중국 특허 제 4683195호 및 제 4683202호) HPV 감염 여부를 진단하기 위하여 쓰이는 대표적인 기술중 하나이다.
- <15> 이러한 PCR 기법은 임상 진단의 실용적 측면에서 Pap smear의 세포검사와 달리 객관적 대규모 검사가 가능하며, 측정원리 상 세포검사나 액상 Hybrid capture에 비해 검사비용, 실험 절차, 검출 감도 및 특이도 등에서 상대적 우위를 갖는 것으로 지적 받고 있다. 이러한 사실에 비추어 볼 때 HPV PCR 검진은 자궁경부암과 전구 병변의 포괄적 일차 선별을 위한 집단 탐색 프로그램을 위한 하나의 매력적인 방법으로 그 활용 여지가 높을 것으로 기대하고 있다. 그러나 아직까지 HPV 감염 여부를 광범위하게 1차적으로 검색하기에 적합한 공통 프라이머(General Primer)가 부족하여 이의 적극적인 임상적 적용에는 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다.
- <16> 현재 전 세계적으로 임상에서 널리 쓰이고 있는 대표적인 공통 프라이머로는 크게 북아메리카와 남아메리카 그리고 아시아에서 주로 사용되고 있는 MY09/MY11 프라이머 세트와 유럽 지역에서 주로 사용되고 있는 GP5+/GP6+ 프라이머 세트 그리고 SPF1/SPF2 프라이머 세트로 구분할 수 있다. 이 외에 최근에 새롭게 개발되어 사용되고 있는 FAP59/FAP64와 PGMY09/PGMY11 등과 같은 프라이머 세트가 현재 널리 사용되어지고 있다.
- <17> 그러나 자궁경부암의 일차 선별을 위한 방법으로서 현존하는 PCR 프라이머 세트는 다수의 HPV 유형 수에 비하면 제한된 수의 유전형 검출에만 국한되어 있고 HPV 유형에 따라 민감도가 떨어지는 등 많은 문제점을 내포하고 있어 본래 공통 프라이머가 지니고 있는 가치와 필요성이 있음에도 불구하고 실제 임상 목적에서의 활용에 큰 제약을 받고 있는 게 현실이다.

- <18> 따라서, 상기한 것과 같은 수십 가지 유형의 종양원성 HPV DNA를 동시에 증폭시킴으로써 검출할 수 있고, HPV 유형에 따른 민감도를 개선시킴으로써 자궁경부암을 조기 선별시킬 수 있는 HPV 공통 프라이머를 개발할 필요성이 커지고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <19> 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 제안된 것으로, 본 발명의 목적은 다양한 유형의 HPV DNA와 상보적으로 결합함으로써 1회의 PCR 과정을 통하여 많은 유형의 HPV를 포괄적으로 증폭시킬 수 있는 뉴클레오티드를 제공하고자 하는 것이다.
- <20> 본 발명의 다른 목적은 상기 뉴클레오티드를 프라이머로 사용함으로써 HPV DNA를 증폭시키고 이에 따라 HPV의 존재 여부를 분석하고, 자궁경부암의 감염 여부를 조기에 진단할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.
- <21> 한편, 본 발명의 다른 목적은 상기 프라이머를 포함함으로써 다양한 HPV 유형의 DNA를 증폭할 수 있는 PCR용 키트를 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <22> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 관점에 따르면 다양한 유형으로 구분되는 HPV DNA를 동시에 포괄적으로 증폭시킬 수 있는 뉴클레오티드(프라이머)를 제공한다.
- <23> 상기 프라이머는 서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드; 서열번호 2와 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드; 서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드; 서열번호 7과 서열번호 8로 구성되는 뉴클레오티드; 서열번호 9와 서열번호 10으로 구성되는 뉴클

레오티드; 서열번호 11과 서열번호 12로 구성되는 뉴클레오티드; 서열번호 13과 서열번호 14로 구성되는 뉴클레오티드; 및 서열번호 15와 서열번호 16으로 구성되는 뉴클레오티드 중에서 선택되는 프라이머인 것을 특징으로 한다.

- <24> 본 발명에 따른 상기 프라이머는 각각 HPV 유형 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 70의 DNA를 증폭시킬 수 있으며, 그 외 다른 유형의 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있다.
- <25> 본 발명의 다른 관점에서는 상기에서 선택된 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 PCR을 수행함으로써 다양한 유형의 HPV DNA를 증폭시킬 수 있으며, 증폭 여부에 따라 샘플 내에 HPV DNA의 존재를 탐지할 수 있는 방법을 제공한다.
- <26> 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- <27> 종래의 PCR법에 의한 여러 유형의 HPV와 혼성화 할 수 있는 공통적인 올리고 뉴클레오티드 프라이머는 현존하는 HPV 유형의 수에 비해 검출할 수 있는 유형의 수가 적고 HPV 유형에 따라서 민감도가 크게 떨어진다. 그러나 본 발명에서는 종전의 PCR 공통 프라이머보다 많은 HPV 유형과 혼성화 할 수 있는 프라이머를 설계하고, 상기 프라이머에 의한 1회의 PCR을 수행하여 다양한 HPV 유형을 검출할 수 있도록 하였다.
- <28> 이를 위하여 본 발명에서는 총 72가지 HPV 유형의 전 서열을 기준으로 컴퓨터 프로그램을 이용하여 대표적인 PCR 공통 프라이머를 설계하였다. 상기 설계된 프라이머는 다른 컴퓨터 프로그램을 사용하여 다양한 HPV 유형에 대한 증폭도를 확인하고 그 중 최종적으로 8조의 프라이머를 선별하였다.

- <29> 상기에서 선별된 프라이머는 핵산자동합성기(Expedite™ 8909 합성기, ABI 사)를 사용하여 합성되었다. 이와 같이 합성된 프라이머는 먼저 대표적인 HPV 감염세포주의 DNA를 표적 DNA로 하여 PCR을 실시하여 HPV를 증폭시키는 것을 확인하였다.
- <30> 또한, 상기 프라이머를 사용하여 다양한 유형의 HPV 플라스미드(plasmid) DNA의 PCR 증폭여부를 실시해 본 결과 모두 이에 상응하는 DNA를 증폭시킨다는 사실을 확인하였다.
- <31> 더욱이 본 발명에서 확인된 프라이머를 사용하여 인체에서 수득한 샘플을 대상으로 PCR 증폭을 수행하여 증폭 여부에 따라 HPV의 감염 여부를 조기에 진단할 수 있다. 본 발명에서는 질확대경진(colposcopy) 등의 임상 병리 검진을 통하여 비정상으로 판정된 환자 20명과 정상으로 판정된 환자 10명을 대상으로 일부 환자에 대해서는 하이브리드 캡처 II법(hybrid capture II, digene 사)과, DNA칩 검사법(biomedlab 사)을 수행하였다. 마지막으로 본 발명에서 확인된 총 8조의 공통 프라이머 중 7조의 프라이머를 사용하여 PCR 시험을 수행하였다. 본 발명에서 확인된 공통 프라이머에 의한 증폭 여부를 수행하면 상기 세포학적 검진법과 하이브리드 캡처 II법 및 DNA칩에 의한 진단법과 동일한 결과를 얻을 수 있었고 정확한 HPV DNA의 감염여부 및 조기 진단이 가능함을 확인하였다.
- <32> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 자세하게 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<33> 실시예 1

- <34> 본 실시예에서는 컴퓨터 시뮬레이션을 통하여 확인한 총 8조의 프라이머를 합성하여 HPV-16 감염세포주인 Caski(ATCC CRL-1550), HPV-18 감염세포주인 HeLa(ATCC CCL-2) 및 HPV 비

감염 세포주인 K562(KCLB-10243, Korean Cell Line Bank)를 대상으로 PCR 증폭시험을 수행하였다.

<35> (1) PCR 프라이머의 설계 및 선별

<36> 본 발명의 목적인 다양한 HPV DNA와 상보적으로 결합하여 상기 HPV DNA를 포괄적으로 증폭시킬 수 있는 PCR 공통 프라이머로서의 뉴클레오티드를 설계하였다.

<37> 우선 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)와 미국립 로스 알라모스 HPV 데이터베이스로부터 HPV-1a, -2a, -3, -4, -5, -6b, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -15, -16, -16r, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -35h, -36, -37, -38, -39, -40, -41, -42, -44, -45, -47, -48, -49, -50, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -60, -61, -63, -65, -66, -67, -68, -70, -72, -73, -75, -76, -77, -80 의 총 72가지 HPV 유형의 전 DNA 염기서열을 확보하였다. 확보한 DNA 서열을 컴퓨터 프로그램 'DNASTAR(MegAlign™ 5, DNASTAR Inc.)'를 활용하여 ClustalW 방법으로 쌍정렬(pairwise alignment) 및 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 실행한 후 분류계통도(Phylogenetic tree)를 작성하고 각 그룹을 대표하는 유형의 염기서열을 선별한 다음, 다시 컴퓨터 프로그램 프라이머 프리미어 5(primer premier 5, PREMIER Biosoft International Co.)를 활용하여 PCR 공통 프라이머를 설계하였다. 이때 프라이머의 길이는 24bp 및 33bp의 올리고 뉴클레오티드로 설정하였으며 PCR 산물의 크기는 200bp ~ 550bp로 제한하여 PCR 공통 프라이머를 선별하였으며, 최종적으로 8조의 프라이머를 선별하였다.

<38> (2) 선별된 PCR 프라이머의 가상 증폭

<39> 상기 과정에서 설계한 총 8조의 프라이머를 대상으로 컴퓨터 프로그램(Amplify 1.2, University of Wisconsin)을 사용하여 설계 과정에서 이미 확보한 총 72가지의 각기 다른 HPV 유형을 대상으로 가상 증폭실험을 수행하였다. 특히, 본 실시예에서는 자궁경부암과 밀접히 관련된 것으로 밝혀진 HPV-2a, -3, -6b, -7, -10, -11, -13, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -61, -66, -67, -68, -70, -73의 36종 HPV 유형을 증폭할 수 있는 것에 우선순위를 두고 선택하고 이 외의 HPV 유형도 다수 증폭하는 공통 프라이머 8조를 최종 선별하여 이를 AlbioGP1, AlbioGP2, AlbioGP3, AlbioGP4, AlbioGP5, AlbioGP6 및 AlbioGP7로 각각 명명하였으며, 프라이머에 따른 서열번호, 증폭유형, 증폭 산물의 크기 및 증폭 위치를 예측하였으며, 이에 대한 결과는 하기 표 1에 표시하였다.

<40> 표 1. 다양한 유형의 HPV DNA의 포괄적 증폭을 위해 선별한 공통 프라이머

<41>	프라이머	서열번호	증폭 HPV 유형	증폭산물 크기(bp)	증폭 위치 (HPV 16)
	AlbioGP1	서열번호 1 서열번호 2	3, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 66, 68, 70, 73, 74, 75, 76, 77	388-406	6379~6773
	AlbioGP2	서열번호 3 서열번호 4	2a, 3, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 77	322-334	6226~6548
	AlbioGP3	서열번호 5 서열번호 6	2a, 3, 6b, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 75, 76, 77	533-542	6230~6762
	AlbioGP4	서열번호 7 서열번호 8	2a, 3, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 68, 70, 73, 74, 77	210-242	6547~6762
	AlbioGP5	서열번호 9 서열번호 10	2a, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 63, 66, 67, 68, 70, 72, 75, 76, 77	432-438	6119~6555
	AlbioGP6	서열번호11 서열번호12	2a, 3, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 73, 74, 77	298-305	5947~6218
	AlbioGP7	서열번호13 서열번호14	2a, 3, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 73, 74, 77	301-312	5947~6254
	AlbioGP8	서열번호15 서열번호16	3, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 73, 74	171-172	6379~6548

<42> 상기 표 1의 서열번호 중 홀수의 서열번호는 정방향 프라이머(Forward primer)로 사용되며 짝수의 서열번호는 역방향 프라이머(Reverse primer)로 사용된다.

<43> (3) 선별된 PCR 공통 프라이머의 합성

- <44> 상기 과정에서 선별된 AlbioGP1, AlbioGP2, AlbioGP3, AlbioGP4, AlbioGP5, AlbioGP6, AlbioGP7 및 AlbioGP8 등 8조의 프라이머를 합성하였다. 상기 프라이머는 올리고 뉴클레오티드 포스포르아미다이트 합성화학에 근거한 고체상 합성기법을 탑재하고 있는 Expedite™ 8909 핵산 합성기(ABI 사)를 이용하여 합성하였다.
- <45> 우선, 합성반응은 올리고뉴클레오티드 3' 말단에 위치한 뉴클레오사이드를 고정시킨 CPG 컬럼에서 수행하였으며, 기본적으로 디트리틸레이션(detritylation), 커플링(coupling), 캡핑(capping) 및 산화(oxidation) 반응을 반복주기로 하여 선별된 프라이머의 올리고뉴클레오티드 중합반응을 행하였다. 합성 종료 후 30% 암모니아수를 CPG 컬럼에 가하여 상기 올리고머를 격리시킨 다음 55℃에서 12시간 이상 탈보호(deprotection)시켜 고속진공(Speed Vac.)으로 농축 건조하였으며 다시 역상액체크로마토그래피 및 음이온교환 크로마토그래피를 행하여 순수 정제하였다. 최종 정제된 올리고머는 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.
- <46> (4) 합성된 PCR 공통 프라이머에 의한 PCR 증폭 시험
- <47> 상기 합성과정에서 합성된 총 8조의 프라이머를 사용하여 HPV DNA의 증폭 여부를 확인하였다.
- <48> 본 실시예에서는 HPV-16 감염 세포주인 Caski(ATCC CRL-1550), HPV-18 감염 세포주인 HeLa(ATCC CCL-2) 및 HPV 비감염 세포주인 K562(KCLB-10243, Korean Cell Line Bank)을 대상으로 PCR 증폭 시험을 수행하였다.
- <49> 우선, Caski와 HeLa는 제조사의 지시에 따라 배양한 다음 0.25% 트립신 용액을 가하여 배양 플라스크로부터 탈락시켜 원심 채집하였으며, K562 역시 제조사의 지시에 따라 배양한 다

음 Dulbecco's phosphate- buffered saline (Gibco 사)으로 세척하고 현미경상에서 세포수를 계측한 다음 2×10^6 세포를 Genomic DNA isolation Kit(Cat. No. K-3032, Bioneer 사)를 이용하여 분리 정제하고 최종적으로 200ul의 DW에 녹여 주형 DNA 용액으로 활용하였다. 또한, 각 HPV 유형의 플라스미드 DNA를 함유하는 각 *E. coli* 균주는 37℃ LB 액체배지에서 16시간 동안 진탕 배양한 다음 'Qiafilter Plasmid Maxi Kit(Cat. No. 12263, QIAGEN 사)'로 분리 정제하여 100ng/ μ l로 농도 조정하였으며, 이들 역시 주형 DNA 용액으로 활용하였다.

<50> PCR 실험을 위한 반응조성은 슈퍼바이오(Super Bio 사)로부터 구입한 10 \times buffer 2.5 μ l, 10 mM MgCl₂ 3.75 μ l, 10 mM dNTP 0.5 μ l, Taq 중합효소 0.5 μ l(1unit)와 프라이머 각 1 μ l (20 pmoles), 증류수 5.2 μ l 그리고 주형 DNA 8.0 μ l로 구성된 반응액을 총 25 μ l로 조정하였다.

<51> PCR cycle은 최초 94℃에서 5분간 예비 가열 후 94℃에서 1분, 50℃에서 1분 그리고 72℃에서 1분간의 cycle을 총 50회 반복한 후 최종적으로 72℃에서 5분간 가열한 후 종료하였으며, 최종 반응액 5 μ l를 DNA 사이즈 스탠더드 마커(size standard marker)와 함께 2% 아가로스 겔(agarose gel)에 부과하여 전기영동 하였다. 이때 전기영동 겔의 염색은 0.00005% 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 용액으로 행하였으며, 겔의 각 경로 상에서 출현한 밴드의 유효 여부는 상기 표 1의 가상증폭 실험에서 얻어진 PCR 산물의 예상크기와 비교하여 판정하였다.

<52> 도 1a 내지 도 1h는 각각 본 발명에서 합성된 8조의 프라이머를 독립적으로 사용하여 Caski, HeLa 및 K562를 표적 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다. 도면에서 M은 스탠더드 마커이고, 도면 상단의 GP1 내지 GP8은 각각 본 실시예에서 사용된 AlbioGP1 프라이머 내지 AlbioGP8 프라이머를 나타낸다. 또한 레인 1은 Caski, 레인 2는 HeLa, 레인 3은 K562를 대상으로 한 것이며, 측면의 숫자는 증폭 산물의 크기를 나타낸다.

<53> 도면에서 볼 수 있는 것과 같이, 본 실시예에서 합성된 총 8조의 프라이머는 HPV 감염 세포주인 Caski와 HeLa에 대해서는 상기 표 1에서 예측한 것과 동일한 크기의 증폭 산물이 얻어졌으나, 비감염 세포주인 K562에 대해서는 증폭이 일어나지 않았음을 알 수 있다.

<54> 실시예 2

<55> 본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 확인한 총 8조의 프라이머 중 AlbioGP 1 프라이머, AlbioGP 2 프라이머, AlbioGP 3 프라이머, AlbioGP 4 프라이머, AlbioGP 5 프라이머, AlbioGP 6 프라이머 및 AlbioGP 7 프라이머 등 7조의 프라이머를 사용하여 보다 다양한 유형의 HPV 플라스미드 DNA를 함유하고 있는 *E.coli* 균주를 대상으로 PCR 실험을 실시하였다.

<56> 본 실시예에서 사용한 균주는 다음과 같다.

<57> HPV-2a (ATCC 45202);

<58> HPV-6b (ATCC 45150);

<59> HPV-11 (ATCC 45151);

<60> HPV-16 (ATCC 45113);

<61> HPV-18 (ATCC 45152);

<62> HPV-31 (ATCC 65446);

<63> HPV-43 (ATCC 40338);

- <64> 상기와 같은 유형의 HPV DNA를 함유하는 각 *E. coli* 균주는 37℃ LB 액체배지에서 16시간 동안 진탕 배양한 다음 'Qiafilter Plasmid Maxi Kit(Cat. No. 12263, QIAGEN 사)'로 분리 정제하여 100ng/ μ l로 농도 조정하였으며, 이들 역시 주형 DNA 용액으로 활용하였다.
- <65> PCR 증폭은 상기 실시예 1과 동일한 반응물과 절차에 따라 각 주형 DNA에 대하여 각 구성 프라이머별로 독립적으로 수행하였다. 겔의 각 경로 상에서 출현한 밴드의 유효여부는 HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-43, HPV-2a, HPV-6b, HPV-11의 DNA에 대하여 상기 실시예 1에서 합성된 7조의 프라이머를 사용한 컴퓨터 가상 증폭실험에어 얻어진 PCR 산물의 크기(하기 표 2 참조)와 비교하여 판정하였다.
- <66> 도 2a 내지 도 2g는 각각 본 실시예에서 합성된 7조의 프라이머를 사용하여 다양한 HPV 균주를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진으로서, 도 2a는 HPV-16 DNA가 삽입된 ATCC 45113 균주, 도 2b는 HPV-18 DNA가 삽입된 ATCC 45142 균주, 도 2c는 HPV-31 DNA가 삽입된 ATCC 65446 균주, 도 2d는 HPV-43 DNA가 삽입된 ATCC 40338 균주, 도 2e는 HPV-2a DNA가 삽입된 ATCC 45202균주, 도 2f는 HPV-6b DNA가 삽입된 ATCC 45140 균주, 도 2g는 HPV-11 DNA가 삽입된 ATCC 45151 균주를 표적 DNA로 한 것이다. 도면 하단의 M은 스탠더드 마커이고, 라인 1은 AlbioGP1, 라인 2는 AlbioGP2, 라인 3은 AlbioGP3, 라인 4는 AlbioGP4, 라인 5는 AlbioGP5, 라인 6는 AlbioGP6, 라인 7은 AlbioGP7를 프라이머로 사용하였음을 표시한 것이다. 또한 측면의 숫자는 본 실시예에서 사용된 마커의 크기를 나타낸다.
- <67> 도면에서 나타난 바와 같이, 본 실시예에서 사용된 7조의 프라이머(AlbioGP1 프라이머 내지 AlbioGP7 프라이머)는 본 실시예에서 사용된 모든 종류의 HPV의 모든 라인에서 하기 표 2에서 예측한 것과 동일한 크기의 증폭 산물이 얻어졌음을 알 수 있으며, 모든 전기영동 사진의 각 경로에서는 유효 밴드와 구분이 곤란한 어떠한 밴드도 나타나지 않았다.

<68> 표 2. 선별된 프라이머 증폭산물의 예상크기

<69>

프라이머	증폭 산물의 예상크기(bp)						
	HPV-16	HPV-18	HPV-31	HPV-43	HPV-2a	HPV-6b	HPV-11
AlbioGP1	397	400	397	391	395	397	392
AlbioGP2	325	325	325	325	322	323	325
AlbioGP3	534	537	534	537	539	531	531
AlbioGP4	215	215	213	214	214	215	215
AlbioGP5	438	438	438	438	432	438	438
AlbioGP6	298	298	298	298	297	293	297
AlbioGP7	301	301	301	301	302	301	301

<70> 따라서, 본 실시예에서 사용된 7조의 프라이머는 각각 HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-43, HPV-2a, HPV-6b 및 HPV-11 DNA에 대한 PCR 증폭 능력이 인정되며 비선택적 증폭도 나타내지 않는 것으로 확인할 수 있다. 본 결과는 컴퓨터 가상 증폭 실험에서 예견된 7조의 프라이머의 선택적 특이 증폭과 모두 일치하였다.

<71> 이를 바탕으로 본 실시예에서 다루지 못한 많은 HPV 유형에 대한 컴퓨터 가상 증폭 결과(표 2)는 실제 PCR 증폭 실험에서도 충분한 의의가 있을 것으로 전망되었다.

<72> 실시예 3

<73> 본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 선별되어 합성된 AlbioGP 8 프라이머를 사용하여 다양한 HPV 유형의 플라스미드를 함유하고 있는 *E.coli* 균주를 대상으로 PCR 실험을 수행하였다.

<74> 본 실시예에서 사용된 균주는 상기 실시예 2에서 사용된 균주와 동일하며, 균주 DNA의 분리 및 PCR 반응은 상기 실시예 1 및 2와 동일한 조건에서 실시하였다.

<75> 다만, 본 실시예에서는 상기 실시예 2와 달리 하나의 PCR 프라이머(AlbioGP 8 프라이머)만을 사용하였으며, 겔의 각 경로에 따라 다른 주형 플라스미드 DNA를 대상으로 전기영동을 실시하였다.

<76> 겔의 각 경로 상에서 출현한 밴드의 유효여부는 HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-43, HPV-2a, HPV-6b, HPV-11의 DNA에 대하여 AlbioGP 8 프라이머를 사용한 컴퓨터 가상 증폭실험에 얻어진 PCR 산물의 크기(하기 표 3 참조)와 비교하여 판정하였다.

<77> 도 3은 AlbioGP8 프라이머를 사용하여 다양한 HPV 균주를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다. M은 스탠더드 마커이고, 측면의 숫자는 마커의 크기를 나타낸다. 레인 1은 HPV-16 DNA가 삽입된 ATCC 45113 균주, 레인 2는 HPV-18 DNA가 삽입된 ATCC 45142 균주, 레인 3은 HPV-31NA가 삽입된 ATCC 65446 균주, 레인 4는 HPV-43 DNA가 삽입된 ATCC 40338 균주, 레인 5는 HPV-2a DNA가 삽입된 ATCC 45202균주, 레인 6은 HPV-6b DNA가 삽입된 ATCC 45140 균주, 레인 7은 HPV-11 DNA가 삽입된 ATCC 45151 균주를 표적 DNA로 한 것이다.

<78> 도면에서 나타난 바와 같이, 본 실시예에서 사용된 AlbioGP8 프라이머는 본 실시예에서 대상 DNA로 선정된 모든 HPV 유형의 DNA에 대해서 하기 표 3에서 예측한 것과 동일한 크기의 증폭 산물이 얻어졌음을 알 수 있으며, 모든 전기영동 사진의 각 경로에서는 유효 밴드와 구분이 곤란한 어떠한 밴드도 나타나지 않았다.

<79> 표 3. AlbioGP8 프라이머 증폭산물의 예상크기

<80>

프라이머	증폭 산물의 예상크기(bp)						
	HPV-16	HPV-18	HPV-31	HPV-43	HPV-2a	HPV-6b	HPV-11
AlbioGP8	171	172	172	171	171	172	172

- <81> 따라서, 본 실시예를 통하여 AlbioGP8 프라이머는 각각 HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-43, HPV-2a, HPV-6b 및 HPV-11 DNA에 대한 PCR 증폭 능력이 인정되며 비선택적 증폭도 나타나지 않는 것으로 확인할 수 있었다. 본 결과는 컴퓨터 가상 증폭 실험에서 예견된 선택적 특이 증폭과 모두 일치하였다.
- <82> 이를 바탕으로 본 실시예에서 다루지 못한 많은 HPV 유형에 대한 컴퓨터 가상 증폭 결과 (표 3)는 실제 PCR 증폭 실험에서도 충분한 의의가 있을 것으로 전망된다.
- <83> 비교예 1
- <84> 본 비교예에서는 임상시료를 대상으로 종래의 세포 검사법에 따른 HPV 감염여부를 확인하였다.
- <85> 포천 중문의료대학 차병원 부인암센터 외래 진료소를 내원한 여성들을 대상으로 담당 임상 의의 책임하에 질확대경진(colposcopy) 검사, 자궁경부 촬영진(cervicography), 조직생검(biopsy), HPV DNA 검사 및 세포진 도말(pap-smear) 등의 전문적 검진을 실시하였다. 총 30명의 환자를 대상으로 세포 검사를 통한 검진 결과는 하기 표 4에 표시하였다.
- <86> 검진결과 하기 표 4에 제시된 바와 같이 자궁경부암 관련 비정상 환자는 세포검사에서 미확인 비정형세포(ASCUS)를 갖는 피검자 6, 9, 11, 12, 19 및 20, 고등급 편평상피내 변병(HSIL)을 갖는 피검자 1, 2, 5, 7, 8, 13, 14, 16, 17 및 18과 미세침윤암(SCC) 환자인 피검자 3, 4, 10 및 15가 포함되었고 나머지 피검자 21~30은 자궁경부암과 관련 없는 정상인으로 분류되었다.

<87> 표 4. 세포검사법에 따른 임상 시험결과

피검자 No.	세포검사	피검자 No.	세포검사	피검자 No.	세포검사
1	HSIL*	11	ASCUS	21	정상
2	HSIL**	12	ASCUS	22	정상
3	SCC***	13	HSIL	23	정상
4	SCC	14	HSIL	24	정상
5	HSIL	15	SCC	25	정상
6	ASCUS	16	HSIL	26	정상
7	HSIL	17	HSIL	27	정상
8	HSIL	18	HSIL	28	정상
9	ASCUS	19	ASCUS	29	정상
10	SCC	20	ASCUS	30	정상

<89> HSIL* : 고등급 편평상피내 변병(High Squamous Intraepithelial lesion)

<90> SCC** : 미세침윤암(Squamous Cell Carcinoma)

<91> ASCUS*** : 미확인 비정형 세포(Atypical Squamous Cell Undetermined significance)

<92> 비교예 2

<93> 본 비교예에서는 상기 비교예 1의 검사 결과, 자궁경부암 관련 비정상 환자 20명과 자궁경부암과 관련 없는 정상인에 대하여 하이브리드 캡처Ⅱ법(Hybrid Capture Ⅱ, Digene사) 검사를 실시하였다. 하이브리드 캡처Ⅱ법에 따른 검진 결과는 하기 표 5에 간략하게 표시하였다.

<94> 표 5에 표시한 것과 같이, 상기 비교예 1에서 비정상인 것으로 검진된 총 20명의 환자 중 피검자 1~11과 13~19는 고위험군 HPV 감염자인 것으로 판명되었으며, 상기 비교예 1에서 정상인 것으로 판정된 피검자 21~ 30은 본 비교예에서도 HPV 비감염인 것으로 판명되었다. 그러

나, 상기 비교예 1에서 미확인 비정형세포(ASCUS)를 갖는 것으로 판정된 피검자 12와 피검자 20은 본 비교예에서는 정상인으로 판명되었다.

<95> 표 5. 하이브리드 캡처Ⅱ를 사용한 HPV 감염 여부 임상 시험결과

<96>

피검자 No.	검진결과(High/Low)	피검자 No.	검진결과(High/Low)
1	+/-	16	+/-
2	+/-	17	+/-
3	+/-	18	+/-
4	+/-	19	+/-
5	+/-	20	+/-
6	+/-	21	-/-
7	+/-	22	-/-
8	+/-	23	-/-
9	+/-	24	-/-
10	+/-	25	-/-
11	+/-	26	-/-
12	-/-	27	-/-
13	+/-	28	-/-
14	+/-	29	-/-
15	+/-	30	-/-

<97> 실시예 4

<98> 본 실시예에서는 상기 실시예 1 및 2를 통하여 그 증폭능력이 확인된 7조의 프라이머 (AlbioGP 1 프라이머 내지 AlbioGP 7 프라이머)를 사용하여 상기 비교예를 통하여 수득한 환자 DNA를 대상으로 임상시험을 실시하여, DNA 증폭 여부에 따라 HPV 감염 여부는 물론 자궁경부 암을 1차적으로 조기 검진할 수 있는 지를 확인하였다.

<99> 우선 상기 비교예 1 및 2의 임상시험을 위해 수득한 피검자들로부터 얻은 DNA 샘플을 대상으로 상기 실시예 1 및 2에서 확인된 총 7조의 프라이머 세트를 사용하여 PCR을 수행하고 전

기영동을 실시하였다. 피검자들의 DNA는 통상의 방법에 따라 수득하였으며, PCR 반응은 상기 실시예 1 및 상기 실시예 2와 동일한 조건 및 절차에서 수행되었다.

<100> PCR 반응 결과, 상기 실시예 1에서 합성된 총 7조의 프라이머 세트는 상기 비교예 1에서 비정상인 것으로 판명된 환자(피검자 1 내지 20)로부터 얻은 DNA 샘플에 대해서만 증폭 산물이 얻어졌으며, 상기 비교예 1에서 정상인 것으로 판명된 환자(피검자 21 내지 30)로부터 얻은 DNA 샘플에 대해서는 증폭이 일어나지 않음을 확인하였다. 이는 자궁경부암 관련 환자 20명과 자궁경부암 비관련 환자 10명의 병인학적 추론과 일치한 것임을 알 수 있었다.

<101> 도 4a 내지 도 4t는 본 발명에 따른 7조의 프라이머 세트를 사용하여 상기 비교예 1의 검진 결과 자궁경부암과 관련있는 것으로 판정된 비정상적인 환자로부터 얻은 DNA 샘플을 대상으로 PCR을 실시하고 전기영동한 사진이다. 도 4a는 피검자 1, 도 4b는 피검자 2, 도 4c는 피검자 3, 도 4d는 피검자 4, 도 4e는 피검자 5, 도 4f는 피검자 6, 도 4g는 피검자 7, 도 4h는 피검자 8, 도 4i는 피검자 9, 도 4j는 피검자 10, 도 4k는 피검자 11, 도 4l은 피검자 12, 도 4m은 피검자 14, 도 4n은 피검자 14, 도 4o는 피검자 15, 도 4p는 피검자 16, 도 4q는 피검자 17, 도 4r은 피검자 18, 도 4s는 피검자 19 그리고 도 4t는 피검자 20의 환자로부터 수득한 DNA를 대상으로 한 것이다. 여기에서 M은 스탠더드 마커이고, 레인 1은 AlbioGP1 프라이머, 레인 2는 AlbioGP2 프라이머, 레인 3은 AlbioGP3, 레인 4는 AlbioGP4 프라이머, 레인 5는 AlbioGP5 프라이머, 레인 6는 AlbioGP6 프라이머 그리고 레인 7은 AlbioGP7 프라이머를 사용하였음을 나타내며, 측면의 숫자들은 마커의 크기이다.

<102> 도시한 바와 같이, 세포검사에 의하여 자궁경부암과 관련있는 것으로 확인된 모든 피검자들에 대해서 증폭이 일어난 것을 알 수 있으며, 그 크기는 상기 표 1의 가상 증폭 결과와 일치하는 것임을 알 수 있었다.

<103> 도 5a 내지 도 5j는 본 발명에 따른 7조의 프라이머 세트를 사용하여 상기 비교예 1의 검진 결과 자궁경부암과 관련 없는 것으로 판정된 정상적인 환자로부터 얻은 DNA 샘플을 대상으로 PCR을 실시하고 전기영동한 사진이다. 도 5a는 피검자 21, 도 5b는 피검자 22, 도 5c는 피검자 23, 도 5d는 피검자 24, 도 5e는 피검자 25, 도 5f는 피검자 26, 도 5g는 피검자 27, 도 5h는 피검자 28, 도 5i는 피검자 29, 도 5j는 피검자 30의 환자로부터 수득한 DNA를 대상으로 한 것이다. 여기에서 M은 스탠더드 마커이고, 레인 1은 AlbioGP1 프라이머, 레인 2는 AlbioGP2 프라이머, 레인 3은 AlbioGP3, 레인 4는 AlbioGP4 프라이머, 레인 5는 AlbioGP5 프라이머, 레인 6는 AlbioGP6 프라이머 그리고 레인 7은 AlbioGP7 프라이머를 사용하였음을 나타내며, 측면의 숫자들은 마커의 크기이다.

<104> 도시한 바와 같이, 세포검사에 의하여 자궁경부암과 관련 없는 것으로 확인된 모든 피검자들에 대해서 아무런 증폭 산물이 얻어지지 않았음을 알 수 있다.

<105> 이상에서 본 발명의 실시예를 설명하였으나, 이는 예시일 뿐, 본 발명의 정신을 벗어나지 않고 다양한 변경과 변형이 가능하다는 것은 당업자에게는 자명할 것이나, 이들은 모두 본 발명의 권리범위에 속한다는 것은 첨부된 청구의 범위를 통해 분명해 질 것이다.

【발명의 효과】

- <106> 상기한 것과 같이 본 발명에서 합성된 올리고 뉴클레오티드는 다양한 HPV 유형과 상보적으로 결합하여 상기 HPV 유형을 포괄적으로 증폭할 수 있는 신규한 PCR 공통 프라이머로 사용될 수 있다.
- <107> 또한 상기한 프라이머는 직접적으로 다양한 HPV를 검출할 수 있는 프로브로서도 활용될 수 있으며, 상기한 프라이머와 대상 HPV를 PCR을 실시하고 증폭여부를 확인함으로써 HPV 유형의 존재 여부를 검출하는데 활용할 수 있어 HPV에 의하여 야기되는 자궁경부암 등의 조기 검진에 활용될 수 있다.
- <108> 이러한 게놈(genome)을 이용한 유전자 접근법은 조기에 감염유무를 진단할 수 있으므로 추후 지속적이고 장기적인 검진을 실시하며, 조기에 발견이 가능할 뿐만 아니라 사전 교육 등을 통해 발생요인을 차단함으로써, 자궁경부암의 예방효과를 기대할 수 있다.
- <109> 특히, 저 예산으로 HPV 진단을 시행함으로써 사업의 효율성을 극대화하고 검진대상자에게 첨단결과를 남들보다 앞서 받을 수 있다는 만족감과 신뢰도를 구축할 수 있다.
- <110> 더욱이 국가적 차원에서 국민전체 건강증진에 일익을 담당할 수 있으며, 홍보 효과와 대 국민 인식전환에 새로운 계기가 될 것으로 사료된다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1 프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2 프라이머);

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3 프라이머);

서열번호 7과 서열번호 8로 구성되는 뉴클레오티드(제 4 프라이머);

서열번호 9와 서열번호 10으로 구성되는 뉴클레오티드(제 5 프라이머);

서열번호 11과 서열번호 12로 구성되는 뉴클레오티드(제 6 프라이머);

서열번호 13과 서열번호 14로 구성되는 뉴클레오티드(제 7 프라이머); 또는

서열번호 15와 서열번호 16으로 구성되는 뉴클레오티드(제 8 프라이머)로 구성되는 군중에서 선택되는 다양한 HPV DNA를 증폭하는 합성된 프라이머.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 내지 상기 제 8 프라이머는 각각 HPV 유형 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 68 및 70 중에서 선택된 HPV DNA를 증폭하는 프라이머로서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 3, 6b, 7, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 62, 64, 73, 74, 75, 76 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 27, 28, 34, 35, 51, 53, 57, 60, 67, 72, 73, 74 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 26, 27, 28, 29, 34, 48, 49, 50, 51, 57, 62, 64, 67, 72, 73, 75, 76 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 4 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 27, 28, 29, 34, 43, 44, 45, 51, 57, 62, 64, 73, 74 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 5 프라이머는 HPV 유형 2a, 7, 28, 29, 42, 53, 63, 66, 67, 68, 72, 75, 76 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 6 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 65, 67, 73, 74 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 7 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 26, 29, 34, 51, 53, 60, 65, 67, 73, 74 및 77 중에서 선택된 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 8 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 65, 67, 70, 73 및 74 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있는

다양한 HPV DNA를 증폭하는 합성된 프라이머.

【청구항 3】

제 2항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 내지 제 8 프라이머는 각각 HPV 유형 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 중에서 선택된 HPV DNA를 증폭할 수 있는 다양한 HPV DNA를 증폭하는 합성된 프라이머.

【청구항 4】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1 프라이머),
서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2 프라이머),
서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3 프라이머),
서열번호 7과 서열번호 8로 구성되는 뉴클레오티드(제 4 프라이머),
서열번호 9와 서열번호 10으로 구성되는 뉴클레오티드(제 5 프라이머),
서열번호 11과 서열번호 12로 구성되는 뉴클레오티드(제 6 프라이머),
서열번호 13과 서열번호 14로 구성되는 뉴클레오티드(제 7 프라이머) 또는
서열번호 15와 서열번호 16으로 구성되는 뉴클레오티드(제 8 프라이머)로 구성되는 군중
에서 선택되는 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하고,

생물학적 샘플로부터 얻어진 핵산을 표적 DNA로 하는 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행함으로써 다양한 HPV의 DNA를 증폭하는 방법.

【청구항 5】

제 4항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 내지 상기 제 8 프라이머는 각각 HPV 유형 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 68 및 70 중에서 선택된 HPV DNA를 증폭하는 프라이머로서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 3, 6b, 7, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 62, 64, 73, 74, 75, 76 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 27, 28, 34, 35, 51, 53, 57, 60, 67, 72, 73, 74 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 26, 27, 28, 29, 34, 48, 49, 50, 51, 57, 62, 64, 67, 72, 73, 75, 76 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 4 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 27, 28, 29, 34, 43, 44, 45, 51, 57, 62, 64, 73, 74 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 5 프라이머는 HPV 유형 2a, 7, 28, 29, 42, 53, 63, 66, 67, 68, 72, 75, 76 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 6 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 65, 67, 73, 74 및 77 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 7 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 26, 29, 34, 51, 53, 60, 65, 67, 73, 74 및 77 중에서 선택된 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 8 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 65, 67, 70, 73 및 74 중에서 선택된 HPV DNA를 더욱 증폭할 수 있는 프라이머인 다양한 HPV DNA를 증

폭하는 방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 내지 제 8 프라이머는 각각 HPV 유형 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 중에서 선택된 HPV DNA를 증폭할 수 있는 다양한 HPV DNA를 증폭하는 방법.

【청구항 7】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1 프라이머),

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2 프라이머),

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3 프라이머),

서열번호 7과 서열번호 8로 구성되는 뉴클레오티드(제 4 프라이머),

서열번호 9와 서열번호 10으로 구성되는 뉴클레오티드(제 5 프라이머),

서열번호 11과 서열번호 12로 구성되는 뉴클레오티드(제 6 프라이머),

서열번호 13과 서열번호 14로 구성되는 뉴클레오티드(제 7 프라이머) 또는

서열번호 15와 서열번호 16으로 구성되는 뉴클레오티드(제 8 프라이머)로 구성되는 군 중에서 선택되는 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하고 생물학적 샘플로부터 얻어진 핵산을 표적 DNA로 하여 상기 표적 DNA를 증폭시키는 과정; 및

상기 증폭과정에서 증폭산물이 존재하는 경우 상기 샘플 내에 HPV 유형이 존재하는 것으로 판단하는 과정을 포함하는 다양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

【청구항 8】

제 7항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 내지 상기 제 8 프라이머는 각각 HPV 유형 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 68 및 70 중에서 선택된 하나 이상의 HPV DNA를 증폭하는 프라이머로서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 3, 6b, 7, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 62, 64, 73, 74, 75, 76 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 27, 28, 34, 35, 51, 53, 57, 60, 67, 72, 73, 74 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 26, 27, 28, 29, 34, 48, 49, 50, 51, 57, 62, 64, 67, 72, 73, 75, 76 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 4 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 27, 28, 29, 34, 43, 44, 45, 51, 57, 62, 64, 73, 74 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 5 프라이머는 HPV 유형 2a, 7, 28, 29, 42, 53, 63, 66, 67, 68, 72, 75, 76 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 6 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 65, 67, 73, 74 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 7 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 26, 29, 34, 51, 53, 60, 65, 67, 73, 74 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 8 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 65, 67, 70, 73 및 74 DNA를 더욱 증폭할 수 있는 프라이머인 다양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 내지 제 8 프라이머는 각각 HPV 유형 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 중에서 선택된 HPV DNA를 증폭할 수 있는 프라이머인 다양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

【청구항 10】

제 7항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 인간으로부터 수득된 것을 특징으로 하는, 다양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

【청구항 11】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1 프라이머),
서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2 프라이머),
서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3 프라이머),
서열번호 7과 서열번호 8로 구성되는 뉴클레오티드(제 4 프라이머),

서열번호 9와 서열번호 10으로 구성되는 뉴클레오티드(제 5 프라이머),
서열번호 11과 서열번호 12로 구성되는 뉴클레오티드(제 6 프라이머),
서열번호 13과 서열번호 14로 구성되는 뉴클레오티드(제 7 프라이머) 또는
서열번호 15와 서열번호 16으로 구성되는 뉴클레오티드(제 8 프라이머)로 구성되는 군중
에서 선택되는 뉴클레오티드;

dNTP 혼합물(dATP, dCTP, dGTP, dTTP);

내열성 중합효소; 및

PCR 완충용액을 포함하는 다양한 HPV 유형을 검출하는 키트.

【청구항 12】

제 11항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 내지 상기 제 8 프라이머는 각각 HPV 유형 10, 11, 13, 16, 18,
30, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 68 및 70 중에서
선택된 하나 이상의 HPV DNA를 증폭하는 프라이머로서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 3, 6b, 7, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 62, 64, 73, 74,
75, 76 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 27, 28, 34, 35, 51, 53, 57, 60,
67, 72, 73, 74 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 26, 27, 28, 29, 34, 48, 49, 50, 51, 57,
62, 64, 67, 72, 73, 75, 76 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 4 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 27, 28, 29, 34, 43, 44, 45, 51, 57, 62, 64, 73, 74 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 5 프라이머는 HPV 유형 2a, 7, 28, 29, 42, 53, 63, 66, 67, 68, 72, 75, 76 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 6 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 65, 67, 73, 74 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 7 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 26, 29, 34, 51, 53, 60, 65, 67, 73, 74 및 77 DNA를 더욱 증폭할 수 있고,

상기 제 8 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 7, 26, 29, 34, 42, 51, 53, 60, 65, 67, 70, 73 및 74 DNA를 더욱 증폭할 수 있는 프라이머인 다양한 HPV 유형을 검출하는 키트.

【청구항 13】

제 12항에 있어서,

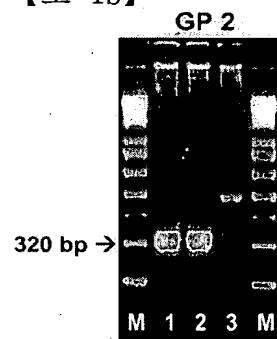
상기 제 1 프라이머 내지 제 8 프라이머는 각각 HPV 유형 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 중에서 선택된 HPV DNA를 증폭할 수 있는 프라이머인 다양한 HPV 유형을 검출하는 키트.

【도면】

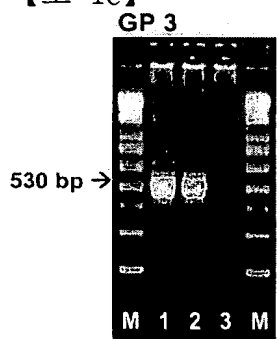
【도 1a】



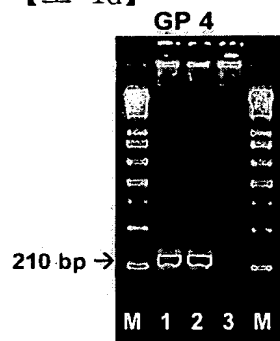
【도 1b】



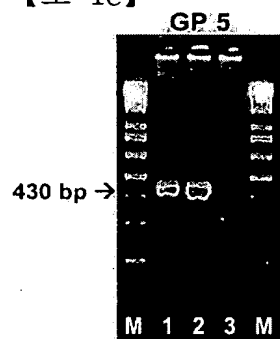
【도 1c】



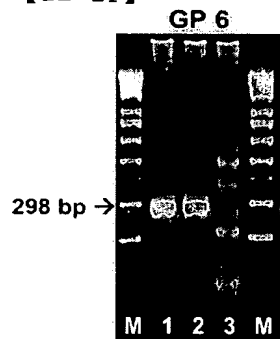
【도 1d】



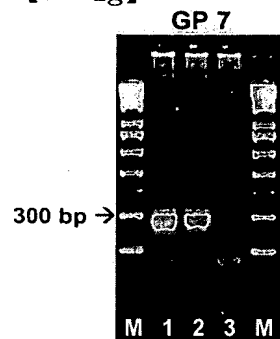
【도 1e】



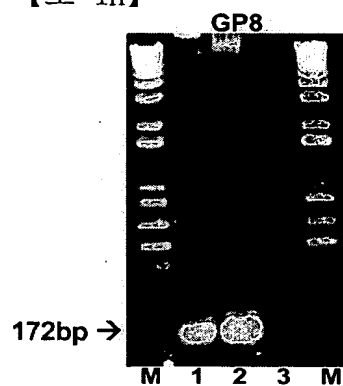
【도 1f】



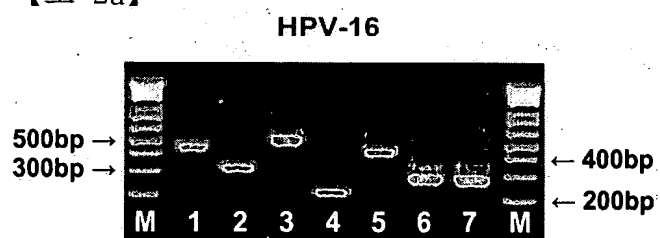
【도 1g】



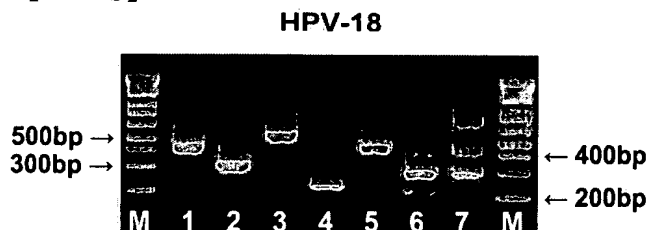
【도 1h】



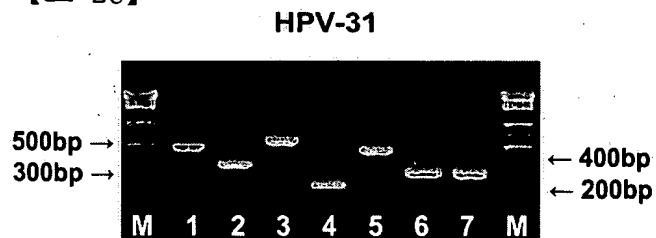
【도 2a】



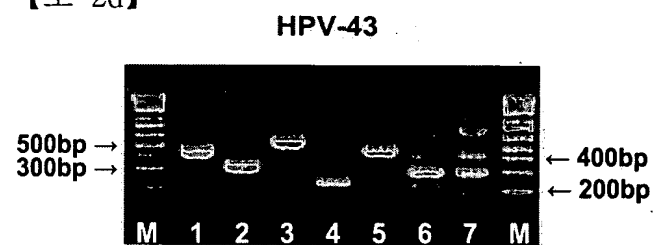
【도 2b】



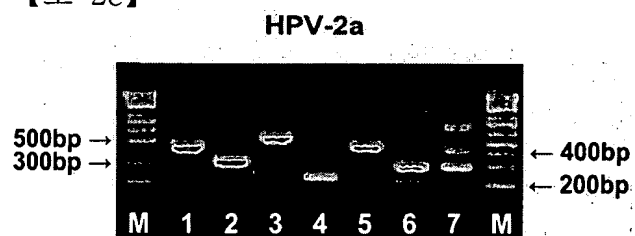
【도 2c】



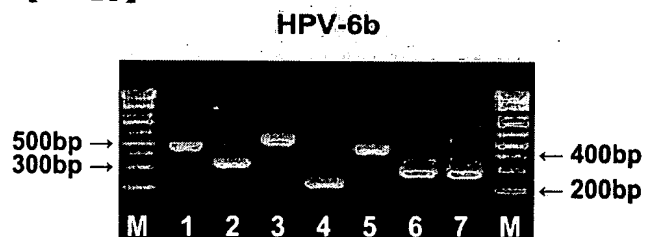
【도 2d】



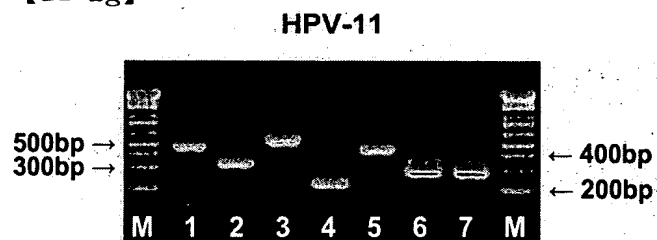
【도 2e】



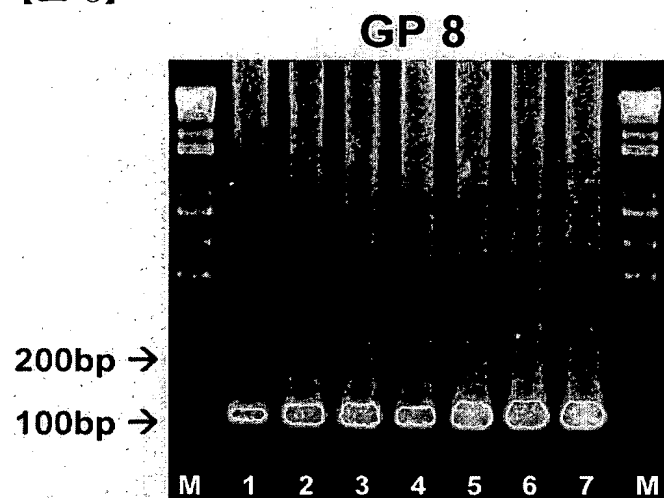
【도 2f】



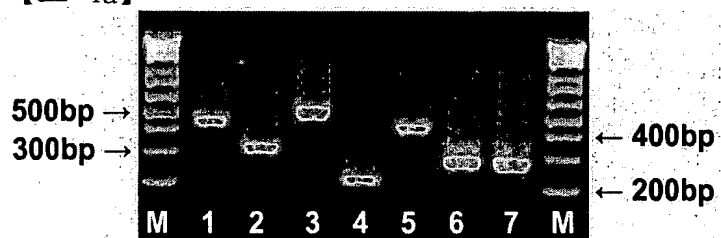
【도 2g】



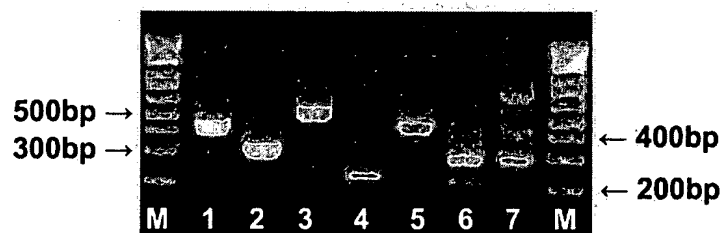
【도 3】



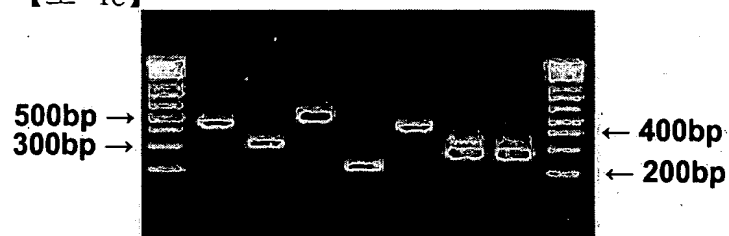
【도 4a】



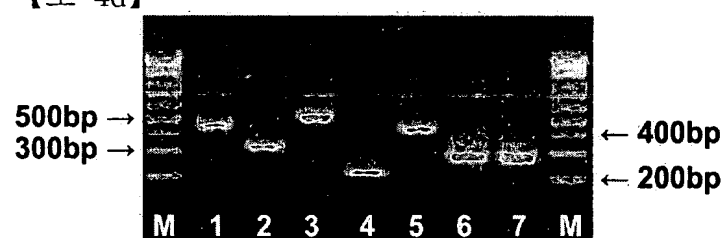
【도 4b】



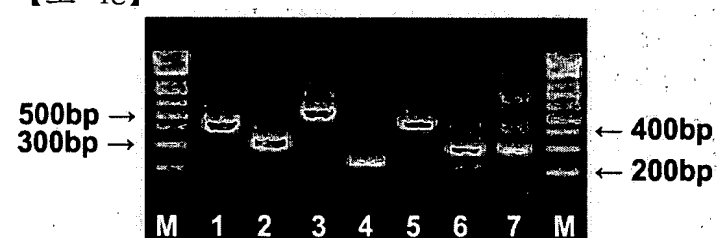
【도 4c】



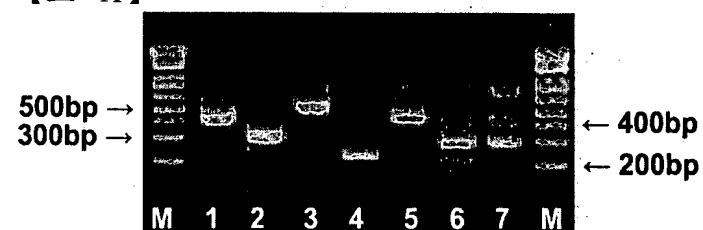
【도 4d】



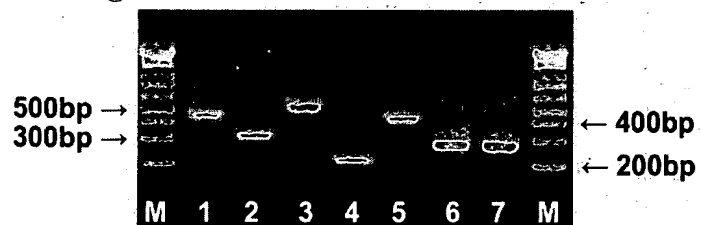
【도 4e】



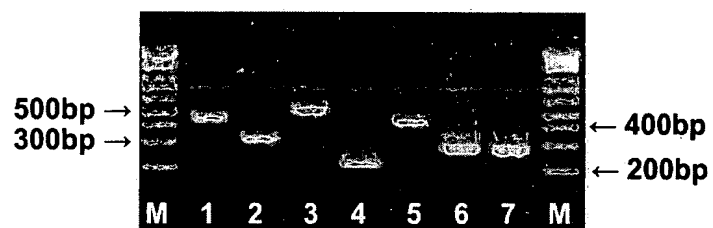
【도 4f】



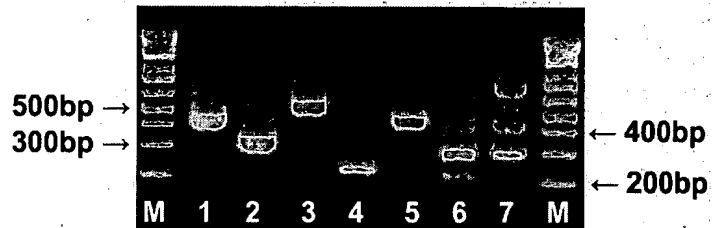
【도 4g】



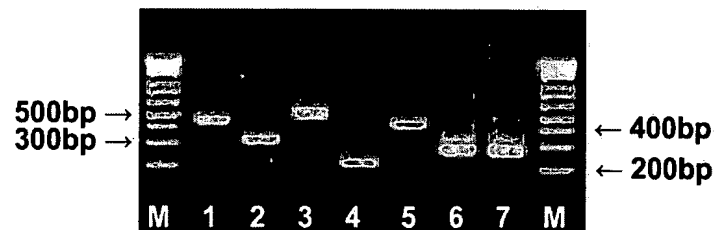
【도 4h】



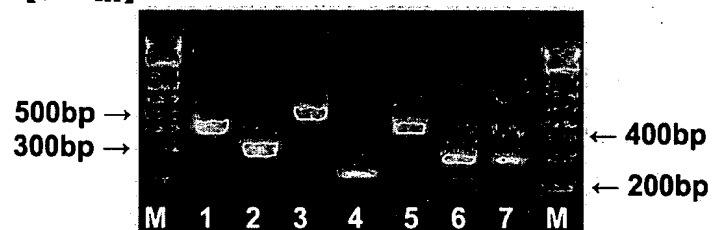
【도 4i】



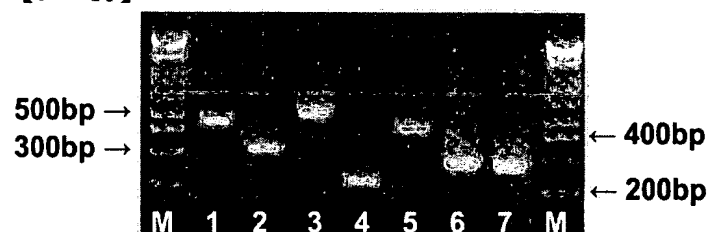
【도 4j】



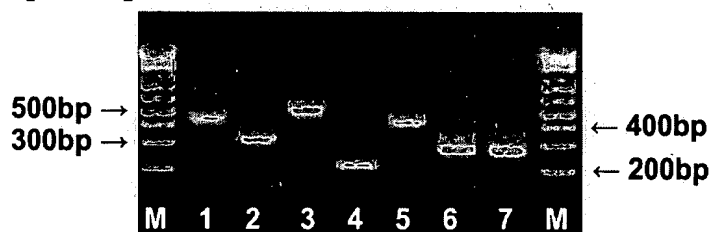
【도 4k】



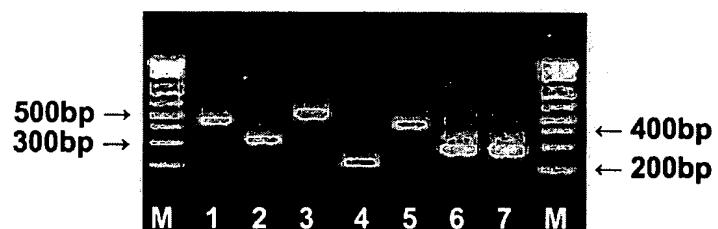
【도 4l】



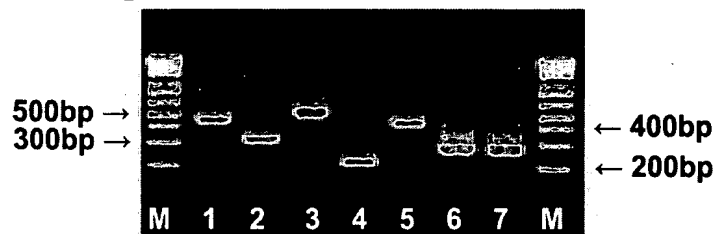
【도 4m】



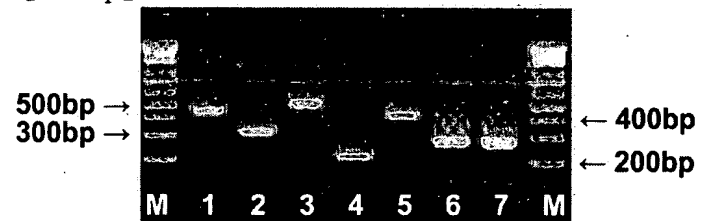
【도 4n】



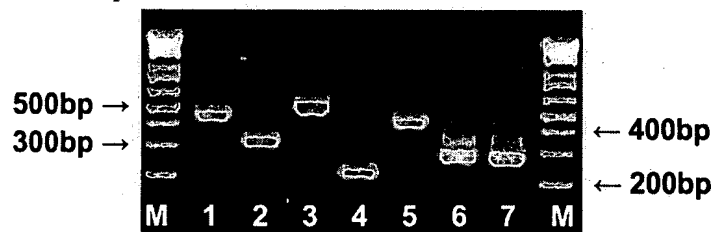
【도 4o】



【도 4p】



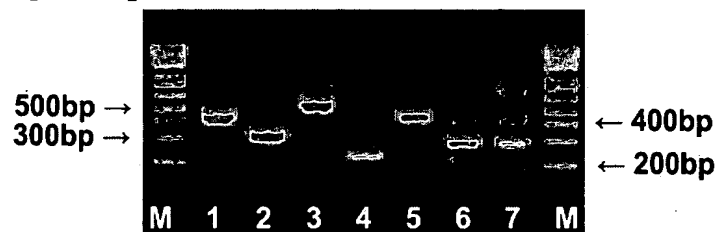
【도 4q】



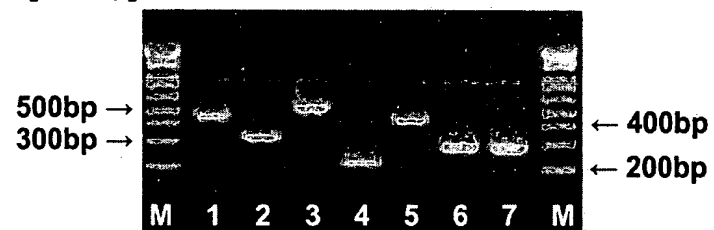
【도 4r】



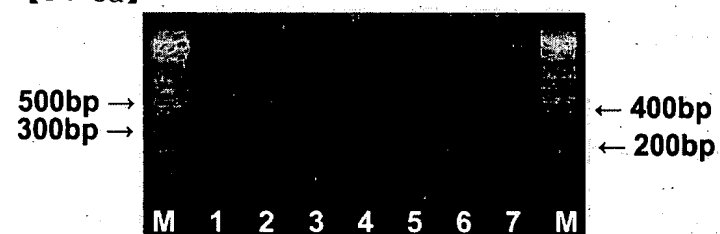
【도 4s】



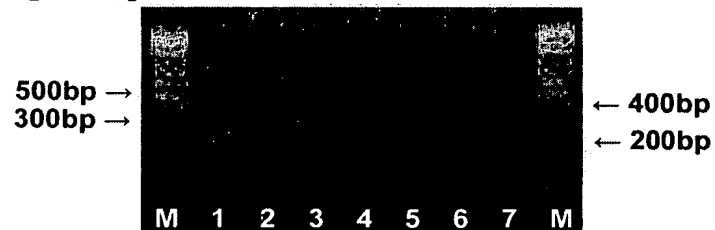
【도 4t】



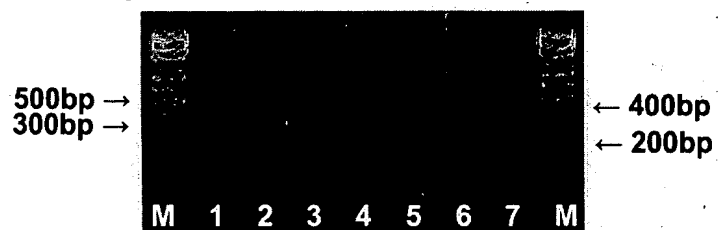
【도 5a】



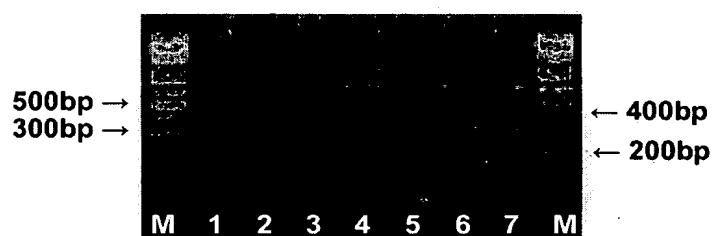
【도 5b】



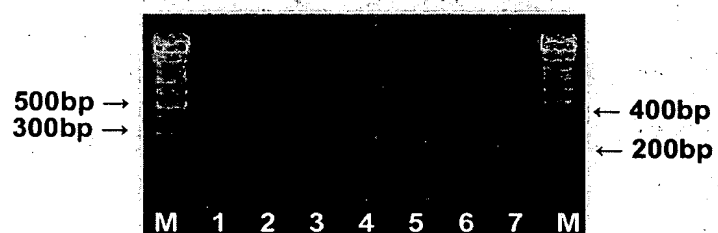
【도 5c】



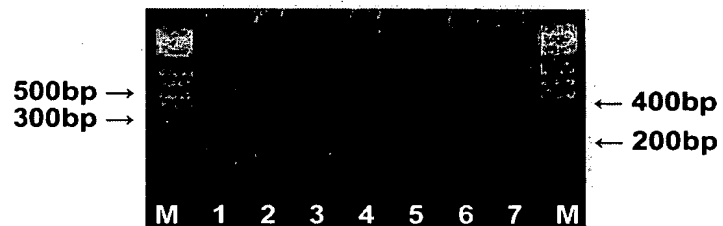
【도 5d】



【도 5e】



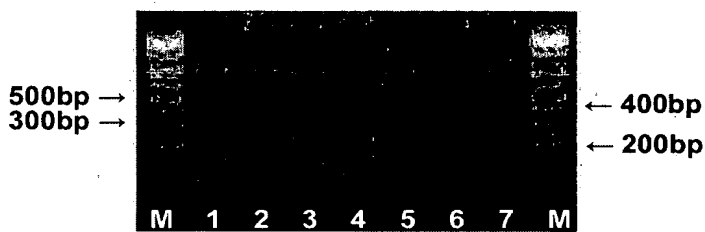
【도 5f】



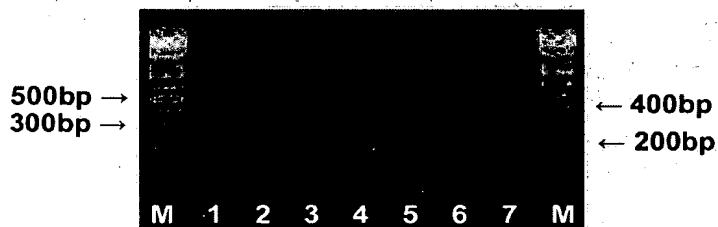
【도 5g】



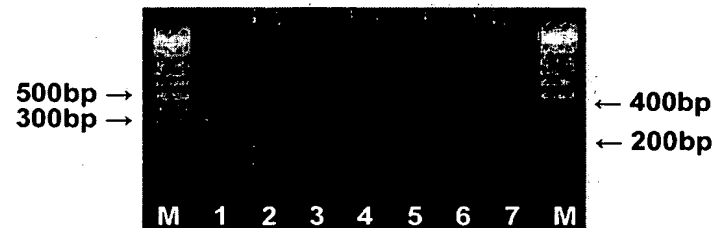
【도 5h】



【도 5i】



【도 5j】



【서열목록】

<110> ALBIOMED Co., LTD <120>

Novel PCR General Primers and Method for

Detecting Diverse Types

of Human Papillomavirus by PCR <160>

16 <170>

KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 1 ttcttcttac gaagggaaca actgtttgtt agaca 35 <210> 2 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 2 cataattgaa acataaactg taaatcatat tcctc 35 <210> 3 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 3 gatggtgata tggtagatac aggatttgg 29 <210> 4 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 4 gcgtcagagg ttaccataga gccactagg 29 <210> 5 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 5 tgatatgggtt catacaggat ttgg 24 <210> 6 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 6 aataaactgt aaatcatatt cctc 24 <210> 7 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 7 gcacaactat ttaataagcc atattgg 27 <210> 8 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 8 aataaactgt aaatcatatt cctc 24 <210> 9 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 9 tgtacctgct attggggaac actgggctaa ggg 33 <210> 10 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer for Amplifying HPV <400> 10 taattgggaa tcagaagtaa ccatagagcc act

33 <210> 11 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Primer for Amplifying HPV <400> 11 gaggtgggcc ggggncarcc nyt

23 <210> 12 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Primer for Amplifying HPV <400> 12 aagccggtgt cgaccatrtc ncrtcyt

28 <210> 13 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Primer for Amplifying HPV <400> 13 gaggtgggcc ggggncarcc nyt

23 <210> 14 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Primer for Amplifying HPV <400> 14 ccgaagccgg tgtcgaycat rtncrt

28 <210> 15 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Primer for Amplifying HPV <400> 15 ttctttcttac gaagggaaca actgtttgtt agaca

35 <210> 16 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Primer for Amplifying HPV <400> 16 gcgtcagagg ttacataga gccactagg